

## Vliv původu ječmene a technologie sladování na obsah ferulové kyseliny v ječmeni a sladu

### *The influence of barley origin and malting technology on ferulic acid content in barley and malt*

ALEXANDR MIKYŠKA, JOSEF PROKEŠ, SYLVIE BĚLÁKOVÁ, JOSEF ŠKACH, DANUŠA HAŠKOVÁ

Výzkumný ústav pivovarský a sladařský, a.s., Lípová 15, 120 44 Praha 2 / *Research Institute of Brewing and Malting, Plc, Lípová 15, 120 44 Praha 2*

e-mail: mikyska@beerresearch.cz

**Mikyška, A. – Prokeš, J. – Běláková, S. – Škach, J. – Hašková, D.: Vliv původu ječmene a technologie sladování na obsah ferulové kyseliny v ječmeni a sladu.** Kvasny Prum. 56, 2010, č. 3, s. 145–151.

Ferulová kyselina je významná fenolická kyselina obsažená v ječmeni. Je antioxidantem s potenciálním vlivem na senzorickou stabilitu piva. Naproti tomu buď termickou dekarboxylací při hvozdnění, rmutování a chmelovaru, nebo enzymovou dekarboxylací v průběhu kvašení piva může z volné ferulové kyseliny vznikat 4-vinyl guajakol, který způsobuje fenolovou cizí vůni a chuť piva. V šestiletých pokusech byla prokázána závislost obsahu ferulové kyseliny v ječmeni na jeho genetických vlastnostech a významná závislost na klimatických podmínkách při vegetaci i v průběhu sklizně jednotlivých ročníků. Sledování volné ferulové kyseliny v laboratorní sladině prokázalo závislost jejího obsahu na odrůdě ječmene, ročníku sklizně i pěstební lokalitě. Žádný z těchto faktorů nebyl dominantní. Podíl volné ferulové kyseliny přítomné ve sladu a ferulové kyseliny uvolněné při rmutování byl závislý na odrůdě ječmene. Odrůdově specifický byl také poměr celkové ferulové kyseliny v ječmeni a volné ferulové kyseliny ve sladině. Obsah volné ferulové kyseliny ve sladině je významně ovlivněn technologií sladování. Vyšší stupeň domočení, vyšší teplota a delší doba sladování vedou k vyššímu obsahu volné ferulové kyseliny ve sladině. Obsah ferulové kyseliny ve sladině koreloval s analytickými parametry popisujícími cytolytické a proteolytické rozluštění sladu.

**Mikyška, A. – Prokeš, J. – Běláková, S. – Škach, J. – Hašková, D.: The influence of barley origin and malting technology on ferulic acid content in barley and malt.** Kvasny Prum. 56, 2010, No. 3, p. 145–151.

Ferulic acid is an important phenolic acid contained in barley. It is an antioxidant with a potential impact on sensorial stability of beer. On the other hand, 4-vinyl guaiacol can be formed from free ferulic acid either by thermal decarboxylation in the course of kilning, mashing and wort boiling or by enzymic decarboxylation during beer fermentation. In six years trials was approved dependence of ferulic acid in barley on its genetical properties and important dependence on climatic circumstances during growth as well as during year crop. Free ferulic acid monitoring in laboratory wort approved dependence of its content on barley variety, year crop and growing locality. Neither of these factors was dominant. A rate of free ferulic content presented in malt and ferulic acid released by mashing was dependent on barley variety. Similarly a rate of total ferulic acid content in barley and free ferulic content in wort was varietal dependent. Free ferulic acid content in wort is markedly influenced by malting technology. Higher steeping degree, higher germination temperature and time lead to higher free ferulic content in wort. Free ferulic content in wort correlated with analytical parameters describing cytolytic and proteolytic modification of malt.

**Mikyška, A. – Prokeš, J. – Běláková, S. – Škach, J. – Hašková, D.: Einfluss der Gerstenursprung und Technologie der Malzherstellung auf den Gehalt an Ferulasäure in der Gerste und im Malz.** Kvasny Prum. 56, 2010, Nr. 3, S. 145–151.

Die Ferulasäure ist eine wichtige in der Gerste enthaltene fenolische Säure, die als einen Antioxidant mit einem potenziellen Einfluss auf sensorische Stabilität des Bieres gibt. Im Gegenteil kann entweder durch eine thermische Dekarboxylierung während des Darrverfahrens, des Darrverfahrens und des Hopfenkochens oder durch eine enzymatische Dekarboxylierung während der Gärung aus der freien Ferulasäure 4-Vinyl Guajakol entstehen, der einen fremden Fenolgeruch und -geschmack des Bieres verursacht. In den sechs-jährigen Versuchen wurde eine Abhängigkeit des Gehalts an Ferulasäure in der Gerste auf ihren genetischen Eigenschaften und weiterhin eine bedeutende Abhängigkeit auf die klimatischen Bedingungen während der Vegetation und der Ernte der einzelnen Jahrgänge nachgewiesen. Die Verfolgung der freien Ferulasäure in der Laborvorderwürze hat die Abhängigkeit ihres Gehalts auf die Gerstensorte, Erntejahrgang und auf das Anbaugelände nachgewiesen, jedoch keiner der angegebenen Parameter wurde signifikant. Der Anteil der im Malz anwesenden und durch das Kochen freigesetzten freien Ferulasäure wurde von der Gerstensorte abhängig. Sorten spezifisch wurde auch das Verhältnis zwischen dem Gehalt an gesamter Ferulasäure in der Gerste und der freien Ferulasäure in der Vorderwürze. Der Gehalt an der freien Ferulasäure in der Vorderwürze wird bedeutend durch die Technologie der Malzherstellung beeinflusst. Ein höherer Gehalt an der freien Ferulasäure in der Vorderwürze wird durch einen höheren Grad des Quellreifens, durch die höhere Temperatur und längere Zeit des Malzkeimungsprozesses verursacht. Der Gehalt an der freien Ferulasäure in der Vorderwürze hat mit analytischen Parametern korreliert, die die zytolytische und proteolytische Malzauflösung des Malzes beschreiben.

**Klíčová slova:** kyselina ferulová, ječmen, slad, sladina, sladování, kvašení

**Keywords:** ferulic acid, barley, malt, wort, malting, fermentation

## 1 ÚVOD

Ferulová kyselina je jednoduchá fenolická kyselina ze skupiny hydroxy-skořicových kyselin, která spolu s proteiny tvoří spojovací můstky mezi lamelami neškrobových polysacharidů, arabinoxylanů a  $\beta$ -glukanů v buněčné stěně ječné obilky (obr. 1) [1]. Je spolu s p-kumarovou kyselinou a vanilovou kyselinou majoritní fenolickou kyselinou ječmene [2]. Při klíčení má zásadní význam enzymatické štěpení těchto spojovacích můstků, které spolu s působením enzymového komplexu degradace  $\beta$ -glukanů a arabinoxylanů (pentosanů) má vliv na extrakt sladu, obsah rozpustných arabinoxylanů,  $\beta$ -glukanů a proteinů ve sladině [3]. Z toho plyne i možná souvislost s filtrovatelností sladin a pív [4].

Ferulová kyselina je při sladování uvolněna působením esteraz (EC

## 1 INTRODUCTION

Ferulic acid is a simple phenolic acid of hydroxy-cinnamic acid group, which along with proteins formed connecting bridges between lamellas of non-starch polysaccharides, arabinoxylans and  $\beta$ -glucans in cell wall of barley corn (Fig. 1) [1]. It is together with p-coumaric acid and vanilic acid major phenolic acid in barley [2]. By germination basic significance has enzymic splitting of these connecting bridges, which with the action of enzymic complex of  $\beta$ -glucans and arabinoxylans degradation has impact on malt extract, soluble arabinoxylans,  $\beta$ -glucans and proteins in wort [3]. It implicates possible connection with wort and beer filterability [4].

Ferulic acid is released by malting by an action of esterases (EC 3.1.1) present in malt [5,6], its activity is depended on barley variety and decreased in the course of malting [5]. There is a further releasing

3.1.1), které jsou přítomny v ječmeni [5,6], jejich aktivita je závislá na odrůdě ječmene a klesá v průběhu sladování [5]. K dalšímu uvolnění ferulové kyseliny dochází při rmutování, značný význam má použitý postup výroby sladin. Esterasy ferulové kyseliny jsou poměrně termolabilní [7] a mají teplotní optimum 30 °C při pH 7,5 [8]. Proto ve sladinách vyrobených postupy s vstříkáním při teplotách přibližně 30 až 50 °C je obsah volné ferulové kyseliny oproti jejímu obsahu ve sladu výrazně vyšší. U postupů s vstříkáním při teplotě 60 °C je ve sladině přítomna prakticky jen ferulová kyselina uvolněná při sladování [9].

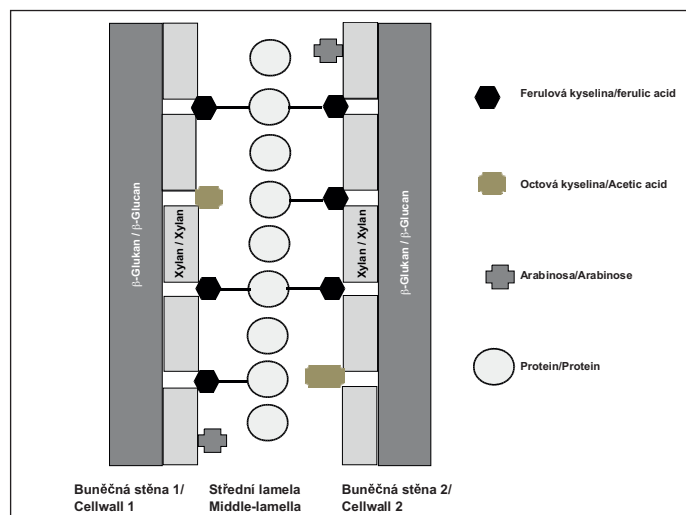
Reakčními mechanismy přeměny ferulové kyseliny jsou oxidace a dekarboxylace [10,11]. Je uváděna jako významný antioxidant, výsledky modelových pokusů prokázaly příznivý vliv této látky na senzickou stabilitu piva [12,13]. Naproti tomu dekarboxylací ferulové kyseliny vzniká 4-vinylguajakol, který je senzickou aktivní a spolu s dalšími těkavými fenoly způsobuje „fenolovou“ cizí vůni a chuť v pivu [10,11]. Ferulová kyselina je ve sladině přítomna ve volné formě i esterově vázaná. Dekarboxylace je možná pouze u volné formy (obr. 2). Prahová hodnota senzického vjemu 4-vinylguajakolu je 0,3 mg/l [14]. 4-Vinylguajakol vzniká z ferulové kyseliny dvěma cestami. První je termická dekarboxylace, která v roztoku, při výrobě sladin a mladiny probíhá při teplotách nad 90 °C a pravděpodobně i při hvozdění sladu [11,15]. Druhá cesta je enzymová dekarboxylace ferulové kyseliny kvasinkami při kvašení a zrání piva. Vysokou aktivitu dekarboxylas (EC 4.1.1) ferulové kyseliny při hlavním kvašení mají divoké kvasinky, některé kmeny svrchního kvašení a mléčné bakterie kontaminující pivovarské provozy [9,11,16, 17].

V zahraničí byly publikovány informace o vlivu odrůdy ječmene, lokality a ročníku sklizně na aktivitu esterasy ferulové kyseliny a tím i vlivu na obsah ferulové kyseliny ve sladu [9, 18, 19]. Získání poznatků o českých odrůdách sladovnického ječmene a dalších sladovnických odrůdách registrovaných v ČR stejně jako informací o vlivu technologie sladování při výrobě méně modifikovaných sladů vhodných pro výrobu Českého piva bylo cílem víceletého výzkumného projektu řešeného v rámci Výzkumného centra pro studium obsahových látek ječmene a chmele.

## 2 MATERIÁL A METODY

Vliv původu ječmene na obsah ferulové kyseliny ve sladu byl v letech 2004 až 2009 (sklizeň 2003–2009) studován na ječmenech ze dvou lokalit s odlišnými půdně-klimatickými podmínkami, Krásné Údolí (pícninářská oblast) a Věrovany (řepařská oblast). Každoročně byly připraveny laboratorní slady z osmi odrůd ječmene. Výběr odrůd se v průběhu řešení měnil, respektoval změny ve skladbě odrůd pěstovaných v České republice a změny ve významu odrůdy.

Slady byly připraveny na mikrosladovně VÚPS následujícím postupem: máčení celkem 10 hodin, máčení s odsáváním CO<sub>2</sub>, stupeň domočení 45 %. Celková doba máčení a klíčení 6 dnů, teplota klíčení 14 °C. Hvozdění 22 hodin, předsušení 55 °C, dotahování 4 hodiny při 80 °C. V roce 2007 byl navíc testován na obsah kyseliny ferulové ve sladině soubor šesti odrůd ze tří lokalit. Byly zvoleny tři české (Bojos, Malz, Tolar) a tři zahraniční (Jersey, Prestige, Xanadu) odrůdy.



Obr. 1 Model struktury buněčné stěny / Fig. 1 Cell wall structure model (Bamforth, C. W. et al: [1])

of ferulic acid in mashing; applied wort production procedure has considerable significance. Ferulic acid esterases are relatively thermo labile [7] and have temperature optimum at 30 °C by pH = 7,5 [8]. Hence free ferulic acid content in worts prepared by procedures with mashing in temperature approximately 30 až 50 °C is distinctively higher compared with its content in malt. In wort only ferulic acid released in malting by procedures with mashing in temperature 60 °C is practically present [9].

Oxidation and decarboxylation are reaction mechanisms of ferulic acid transformation [10,11]. It is mentioned as an important antioxidant, results of model experiments demonstrated positive impact of this compound on beer sensorial stability [12,13]. In contrast, sensorial active 4-vinylguaiacol, what creates “phenolic” off-flavor in beer along with another volatile phenols is formed by ferulic acid decarboxylation [10,11]. Ferulic acid inheres in beer both in free and ester-bonded form. Decarboxylation is possible by free ferulic acid only (Fig. 2). Sensorial threshold of 4-vinyl guaiacol is 0,3 mg/l [14]. 4-Vinyl guaiacol is formed from ferulic acid by two pathways. First one is thermal decarboxylation, proceeding at the temperatures above 90 °C in water solutions, in the course of wort production, wort boilig and probably also by kilning of malt [11,15]. Second one is enzymic decarboxylation of ferulic acid by an action of yeast in the course of beer fermentation and maturation. High decarboxylases (EC 4.1.1) activity have wild yeast species, some ale yeast strains and lactic bacteria contamination of brewing plants [9,11,16, 17].

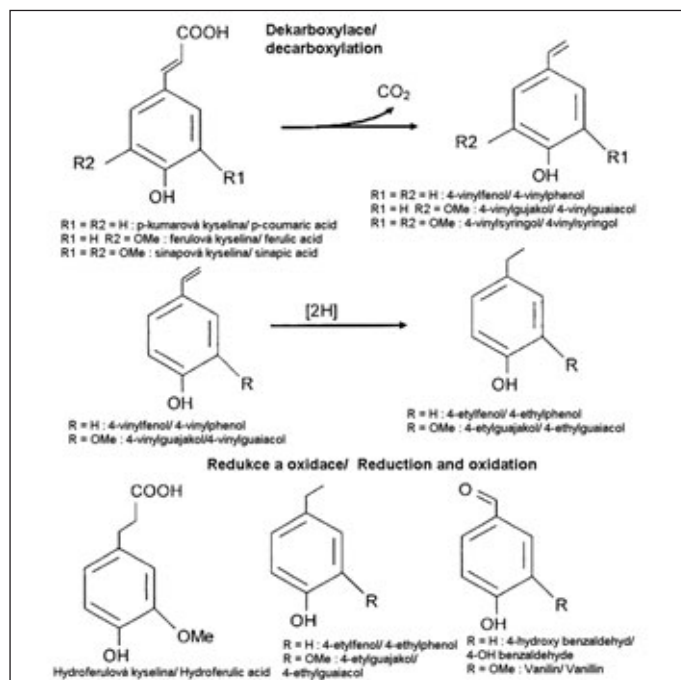
Several information were published about the influence of barley variety, locality and year crop on ferulic acid esterases and thereby on the influence on ferulic acid content in malt [9, 18, 19]. The aim of multiannual research project solved within the framework of the Research Centre of Extract Compounds of Barley and Hops was to receive knowledge about Czech malting barley varieties and other malting barley varieties registered in CR as well as information about the influence of malting technology by less modified malts suitable for Czech beer production.

## 2 MATERIAL AND METHODS

In the years 2004 through 2009 (year crops 2003–2008) an influence of barley origin on ferulic acid content in malt on barleys originated from two growing localities different in soil-climatic conditions, Krásné Údolí (forage production region) a Věrovany (sugar beet production region) was studied.

There were laboratory malts of eight barley varieties every year prepared. Select of varieties changed with respect to changes in varietal structure in the Czech Republic and changes in variety significance in the course of trials.

Malts were prepared by following procedure in micro-malting plant



Obr. 2 Reakce ferulové kyseliny / Fig. 2 Ferulic acid reactions (Vanbeneden, N. et al: [11])

Lokality Branišovice (kukuřičná oblast), Věrovany (řepařská oblast) a Vysoká (bramborářská oblast) se výrazně liší půdně klimatickými podmínkami. Ječmeny byly sladovány na mikroskladovně postupem pro hodnocení odrůd ječmene podle EBC [20].

Vliv sladařské technologie na obsah volné ferulové kyseliny ve sladu (sladině) byl v tříletých pokusech zkoumán v modelových podmínkách. V mikroskladovně byly v letech 2006 až 2008 každoročně připraveny slady ze tří odrůd ječmene (Nordus – Scarlett – Tolar, Kompakt – Scarlett – Tolar, Jersey – Malz – Sebastian). Byly připraveny varianty sladu s nastavením tří parametrů ve dvou úrovních: Obsah vody 42 a 45 %, celková doba klíčení 5 a 7 dnů a teplota klíčení 14 a 18 °C. Hvozdění bylo jednotné, 22 hodin, předsušení 55 °C, dotahování 4 hodiny při 80 °C. Dále byly v provozu sladoven s šestidenní technologií sladování odebrány vzorky zeleného sladu po 4 a 6 dnech a hvozděny v laboratorním hvozdě. Z těchto sladů byla v pokusném pivovaru (kapacita 40 l horké mladiny) uvařena 12% ležácká piva dvoumrtvým dekokčním postupem s vystříkací teplotou 37 °C.

Celkový obsah ferulové kyseliny a obsah volné ferulové kyseliny v ječmeni, sladu a laboratorní sladině byl v letech 2004 až 2007 stanoven metodou HPLC, vypracovanou na VÚPS [21]. V roce 2008 a 2009 (ročník sklizně 2007 a 2008) byla použita vylepšená metoda separace na SPE kolonách a stanovení na přístroji UPLC/PDA [22]. Rozbory ječmene, sladu a piva byly provedeny podle Analytiky EBC [23] a Pivovarsko-sladařské analytiky [24].

### 3 VÝSLEDKY A DISKUSE

#### 3.1 Obsah ferulové kyseliny v ječmeni

V šestiletém období byl sledován celkový obsah ferulové kyseliny v odrůdách ječmene. Do souboru osmi testovaných odrůd byly v každé sklizni zařazeny sladovnické odrůdy ječmene pěstované v České republice s aktuálním významem pro domácí sladovny a pivovary. Vybírány byly jak odrůdy vhodné pro výrobu Českého piva, tak zahraniční odrůdy pro exportní slady. Tři odrůdy, Jersey, Prestige a Tolar, byly hodnoceny celých šest let. Ve třech nebo čtyřech sklizních byly tři odrůdy doporučené pro výrobu Českého piva, Bojos, Malz, Radegast a dvě zahraniční odrůdy. Průměrný obsah ferulové kyseliny u odrůd v jednotlivých sklizních je uveden v tab. 1.

Rozdíly mezi odrůdami v konkrétní sklizni byly často výrazné a statisticky průkazné, jak je patrné u výběrů odrůd ze sklizní 2003 až 2005 (obr. 3) a výběru ze sklizní 2005 až 2008 (obr. 4). Z pohledu opakovaného sledování více sklizní není patrný dominantní vliv od-

of RIBM: Steeping 10 hours at a whole, germination with CO<sub>2</sub> exhaustion, steeping degree 45 %, kilning 4 hours at the temperature of 80 °C. Additionally, collection of six varieties grown in three localities on ferulic content in wort in the year 2007 was tested. Three Czech varieties (Bojos, Malz, Tolar) and three foreign (Jersey, Prestige, Xanadu) varieties were selected. Localities Branišovice (maize production region), Věrovany (sugar beet production region), Vysoká (potato production region) are significantly different in soil-climatic conditions. Barleys were malted using procedure according EBC barley varieties evaluation in micro-malting plant [20].

An influence of malting technology on free ferulic acid content in malt (wort) was investigated in model conditions in triennial trials. In the years 2006–2008 every year malts from three barley varieties (Nordus – Scarlett – Tolar, Kompakt – Scarlett – Tolar, Jersey – Malz – Sebastian) in micro-malting plant were prepared. There were prepared malt variants with adjustment of three parameters in two levels: Steeping degree 42 and 45 %, total germination time 5 and 7 days, germination temperature 14 and 18 °C. Kilning was the same, 22 hours, drying 55 °C, kilning 4 hours at the temperature of 80 °C. Additionally, malt samples were taken after 4 and 6 days in malting plants using six days technology and kilned in a laboratory kiln. 12% pale lager beers were brewed from these malts in the trial brewery (capacity 40 l of hot wort) by the use of two mash decoction procedure with mashing in temperature of 37 °C.

The total ferulic acid content and free ferulic acid content in barely, malt and laboratory wort was accessed by the use of HPLC method developed at RIBM in the years 2004–2007 [21]. Improved method of separation on SPE columns and determination by UPLC/PDA device was used in the years 2008 and 2009 (year crop 2007 and 2008) [22]. Analysis of barley, malt and beer was carried out according to Analytica EBC [23] and Pivovarsko-sladařská analytika [24].

### 3 RESULTS AND DISCUSSION

#### 3.1 Ferulic acid content in barley

In six years period the total content of ferulic acid in barley varieties was investigated. Malting barley varieties with an actual significance for domestic malting houses and breweries, grown in the Czech Republic were filed into the collection of eight varieties in every year crop. Both varieties convenient for Czech beer production and foreign varieties for export malts were selected. Three varieties, Jersey, Prestige and Tolar were evaluated whole six years. Three va-

Tab. 1 Celkový obsah ferulové kyseliny v ječmeni / Total ferulic acid content in barley (mg/kg)

Ročník Year	Odrůda ječmene / Barley variety															Lokalita Locality	
	Aksamit	Amulet	Blaník	Bojos	Diplom	Jersey	Kompakt	Malz	Prestige	Radegast	Sabel	Scarlett	Sebastian	Tolar	Xanadu	KUD	VER
2003		480				545	526	770	632		729	751		664		660	724
2004		542				600	623	662	723		737	687		712		652	669
2005		698		590		747	608	689	686	645				759		688	668
2006				606		730		629	708	575			718	753	544	722	857
2007*				778		900		856	941	940			883	950	766	835	918
2008*	894		821	878	956	1093			1222	945			963	1146	742	956	976

\* vylepšený analytický postup / improved analytical procedure

Tab. 2 Volná ferulová kyselina ve sladině / Free ferulic acid in wort (mg/kg)

Ročník Year	Odrůda ječmene / Barley variety															Lokalita Locality	
	Aksamit	Amulet	Blaník	Bojos	Diplom	Jersey	Kompakt	Malz	Prestige	Radegast	Sabel	Scarlett	Sebastian	Tolar	Xanadu	KUD	VER
2003		3.36				3.59	3.76	3.73	3.22		3.43	3.41		3.15		3.58	3.33
2004		2.63				2.87	3.16	3.50	2.63		2.44	3.00		2.96		2.97	2.83
2005		3.94		3.85		4.19	4.23	4.61	3.72	2.94				3.08		3.77	3.87
2006				2.82		3.58		3.33	3.28	3.17			3.01	3.12	2.84	3.04	3.25
2007*				5.83		8.04		7.72	7.57	5.98			7.92	5.84	7.45	7.12	6.97
2008*	7.12		8.19	5.61	6.77	7.41			6.34	7.72			7.82	8.24	6.90	7.55	6.86

\* vylepšený analytický postup / improved analytical procedure



růdy ječmene. Výsledky analýzy inovovaným postupem jsou vyšší, hodnocení sklizní 2007 a 2008 není proto plně porovnatelné s předchozími výsledky. Přes to je zřetelný vliv ročníku sklizně a patrný je i trend ke zvyšování obsahu ferulové kyseliny v ječmeni (obr. 5). Určitý vliv měla i lokalita, trend k vyššímu průměrnému obsahu ferulové kyseliny v ječmeni byl patrný u lokality Věrovany s lepšími půdně klimatickými podmínkami pro pěstování sladovnického ječmene (tab. 1).

Ferulová kyselina je integrována do struktury neškrobových polysacharidů ječmene, arabinoxylanů a  $\beta$ -glukanů. Příčinou relativně malých rozdílů mezi odrůdami ječmene v obsahu ferulové kyseliny by mohla být skutečnost, že sladovnické odrůdy ječmene jsou šlechtěny na nízký obsah těchto sacharidů s negativním vlivem na filtraci sladin a piva a v registračním řízení hodnoceny podle obsahu  $\beta$ -glukanů. Průkazná závislost mezi obsahem ferulové kyseliny a neškrobových polysacharidů v ječmeni nebyla v rámci pokusů nalezena (sklizeň 2007, 2008:  $\beta$ -glukany  $r = 0,234$ , arabinoxylany  $r = 0,357$ ).

### 3.2 Ferulová kyselina ve sladu

Při zpracování ječmene na slad je část ferulové kyseliny obsažené v ječmeni uvolněna působením enzymů. Určitý podíl ferulové kyseliny přechází do buněčných struktur kořínků a stříšky a odstraní se jako odpad, sladový květ. V průběhu klíčení a první fáze hvozdní, sušení sladu, jsou enzymovou činností rozrušeny buněčné struktury obilky ječmene, uvolněny a částečně degradovány neškrobové polysacharidy. K uvolnění  $\beta$ -glukanů dochází především v průběhu klíčení, arabinoxylany jsou uvolněny později a enzymově degradovány zejména při sušení sladu [25]. V průběhu sladování je uvolněna pouze malá část z celkového obsahu ferulové kyseliny v ječmeni. Obsah volné ferulové kyseliny se v laboratorních sladech odrůd testovaných v letech 2004–2006 pohyboval v intervalu 2,1 až 4,2 % celkového obsahu ferulové kyseliny ve sladu (obr. 6). Toto zjištění je v souladu s literárními údaji [9].

Při rmutování dochází k další degradaci neškrobových polysacharidů a k dalšímu uvolnění esterových vazeb ferulové kyseliny. Na obr. 7 je znázorněna bilance podílu volné ferulové kyseliny ve sladu a ferulové kyseliny uvolněné ze sladu při laboratorním rmutování. U odrůd Amulet, Kompakt, Malz obsah volné ferulové kyseliny ve sladině pocházel převážně ze sladu. U dalších odrůd – Sabel, Scarlett se vyšší podíl ferulové kyseliny uvolnil při rmutování. Je zřejmé, že postup rmutování se významně podílí na koncentraci volné ferulové kyseliny ve sladině.

Sladové enzymy katalyzující hydrolýzu neškrobových polysacharidů i esterasy hydroxyskořicových kyselin jsou termolabilní [7]. K nárůstu obsahu ferulové kyseliny ve sladině proto dochází u rmutovacích postupů s nižšími teplotami vystírky. Při teplotě vystírky 60–63 °C jsou tyto enzymy rychle inaktivovány a ve sladině je přítomna prakticky jen volná ferulová kyselina sladu. Kongresní postup rmutování s vystírkou a výdrží při teplotě 45 °C relativně dobře predikuje množství volné ferulové kyseliny ve sladině pro zpracování sladu dekokčním postupem v provozu domácích pivovarů.

Výsledky stanovení obsahu volné ferulové kyseliny ve sladině jsou shrnuty v tabulce 2. Rozdíly mezi odrůdami ječmene v konkrétní sklizni byly často značné a statisticky průkazné, jak je patrné u výběrů odrůd ze sklizní 2003 až 2005 (obr. 8) a výběru ze sklizní 2005 až 2008 (obr. 9). Významnou měrou se projevil ročník sklizně. Výsledky tří odrůd testovaných 6 let (Jersey, Prestige a Tolar) jsou na obr. 10. Poměr celkové ferulové kyseliny v ječmeni a volné ferulové kyseliny v kongresní sladině, míra jejího uvolnění při sladování a rmutování, závisí na odrůdě ječmene. Byly nalezeny dobré korelace pro opako-

varieties recommended for Czech beer production, Bojos, Malz, Rade-gast and two foreign varieties were evaluated for three or four years period. Average ferulic acid content of barley varieties in particular year crops are shown at Tab. 1.

As it is evident from varieties select from year crops 2003–2005 (Fig. 3) and varieties select from year crops 2005–2008 (Fig. 4), differences were often distinctive and statistically evidential among varieties. From the point of view repeated monitoring more year crops, dominant impact of barley variety is not apparent. Results reached by improved procedure of analyze are higher, therefore year crops 2007 and 2008 evaluation is not full comparable with former results. Through that the influence of year crop is transparent and a trend to increase in ferulic acid content in barley is apparent (Fig. 5). Also locality had some impact; trend to higher average ferulic acid content in barley was marked for the locality Věrovany which has better soil-climatic conditions for malting barley growing (Tab. 1).

Ferulic acid is integrated into the non starch polysaccharides structure of barley, arabinoxylans and  $\beta$ -glucans. A reason of relative small differences in ferulic acid content among barley varieties might be the fact that malting barley varieties are bred to low content of these polysaccharides with negative influence on wort and beer filterability and the varieties are evaluated according to  $\beta$ -glucans content in proceeding of variety registration. In the frame of these trials, there were not found out evidential dependence between ferulic acid and non starch polysaccharides content in barley (year crops 2007, 2008:  $\beta$ -glucans  $r = 0,234$ , arabinoxylans  $r = 0,357$ ).

### 3.2 Ferulic acid in malt

A part of ferulic acid engaged in barley is released by enzymes action during processing barley to malt. Some portion of ferulic acid transfers to cell structures of roots and acrospire and it is steamed off as waste, malt culms. Barley corn cell walls are decomposed by enzyme action during germination and first stage of kilning, malt drying, non starch polysaccharides are released and particularly degraded.  $\beta$ -glucans are released mainly in the course of germination, arabinoxylans are released later and enzymatic degraded especially by malt drying [25] (Fig. 6).

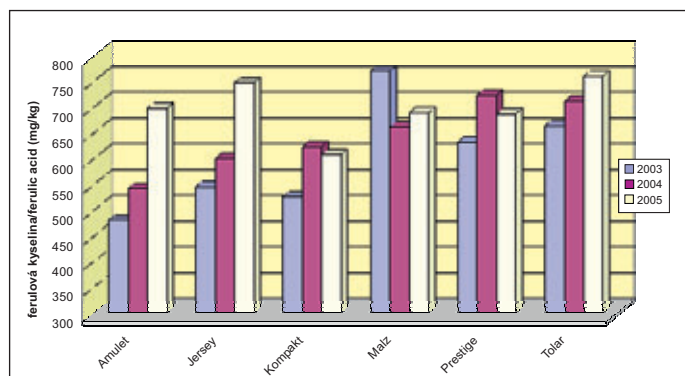
Only small part of the whole ferulic acid content in barley is released in the course of malting process. Relative content of free ferulic acid was in interval from 2.1% to 4.2 % of the total ferulic acid content in laboratory malts from varieties tested in years 2006–2006. This finding is in agreement with literature indications [9].

Further degradation of non starch polysaccharides as well as further ester linkages of ferulic acid occurs in the course of mashing. Balance of a part of free ferulic content and a part of ferulic acid content released during laboratory mashing from malt is shown at Fig. 7.

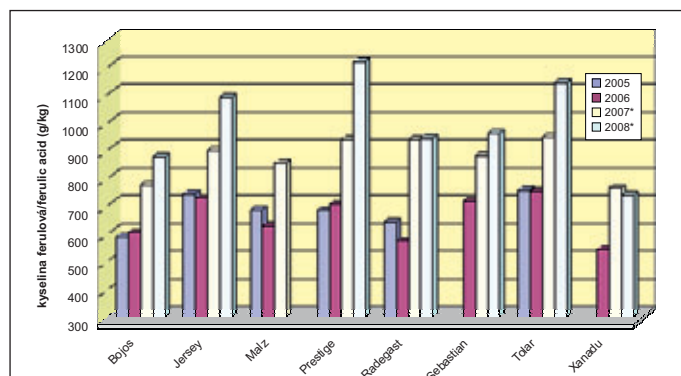
Free ferulic acid content in wort originated mainly from malt by the varieties Amulet, Kompakt and Malz. By other varieties – Sabel, Scarlett higher part of ferulic acid was released by mashing. It is clear, that mashing procedure has significant impact on free ferulic acid concentration in wort.

Malt enzymes catalyzing non starch polysaccharides hydrolysis and hydroxycinnamic acid esterases are thermo labile [7]. Therefore ferulic acid content increase happens by mashing procedures with lower mashing in temperatures. These enzymes are promptly inactivated at mashing in temperatures 60–63 °C and there is practically only free ferulic acid of malt present in wort. Congress mashing procedure with initial temperature and a delay at a temperature of 45 °C predict the free ferulic acid content in wort after malt processing by

Obr. 3 Obsah volné ferulové kyseliny v ječmeni – vybrané odrůdy / Fig. 3 Ferulic acid content in barley – selected varieties (2003–2005)

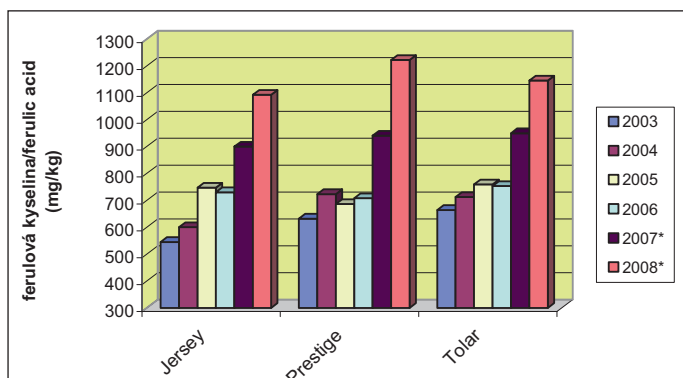


Obr. 4 Obsah volné ferulové kyseliny v ječmeni – vybrané odrůdy / Fig. 4 Ferulic acid content in barley – selected varieties (2005–2008)



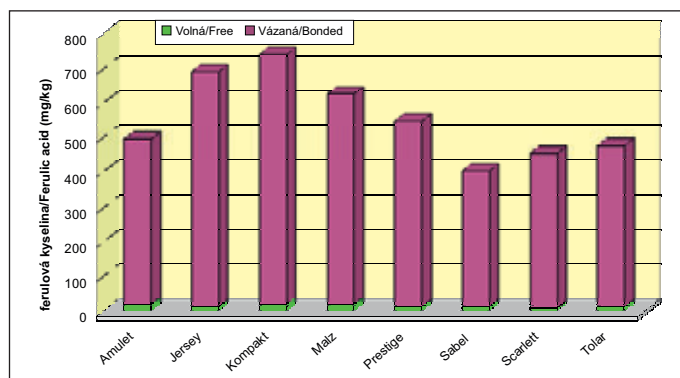
\* vylepšený analytický postup / improved analytical procedure

Obr. 5 Obsah volné ferulové kyseliny v ječmeni – vybrané odrůdy / Fig. 5 Ferulic acid content in barley – selected varieties (2003–2008)

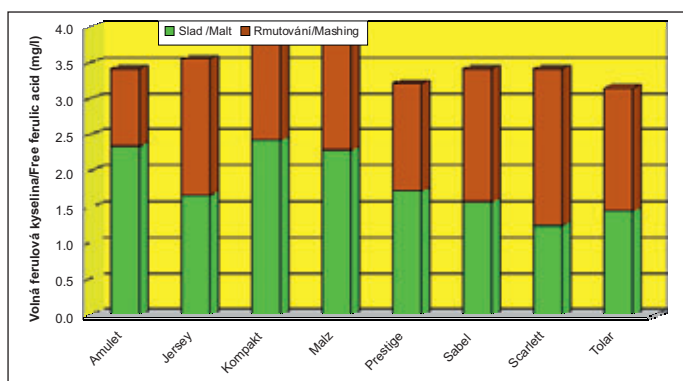


\* vylepšený analytický postup / improved analytical procedure

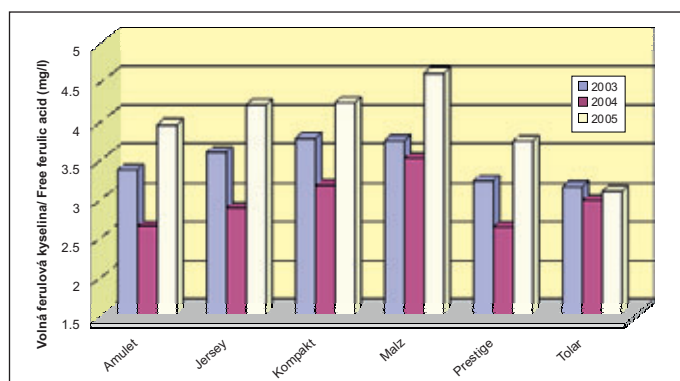
Obr. 6 Obsah volné a vázané ferulové kyseliny ve sladu / Fig. 6 Free and bonded ferulic acid content in malt



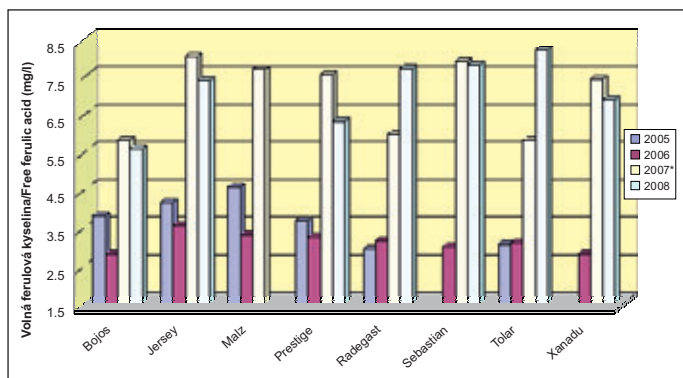
Obr. 7 Bilance příspěvku sladu a rmutování k obsahu volné ferulové kyseliny ve sladině / Fig. 7 Bilance of malt and mashing contribution to free ferulic acid content in wort



Obr. 8 Obsah volné ferulové kyseliny v ječmeni – vybrané odrůdy / Fig. 8 Ferulic acid content in barley – selected varieties (2003–2005)

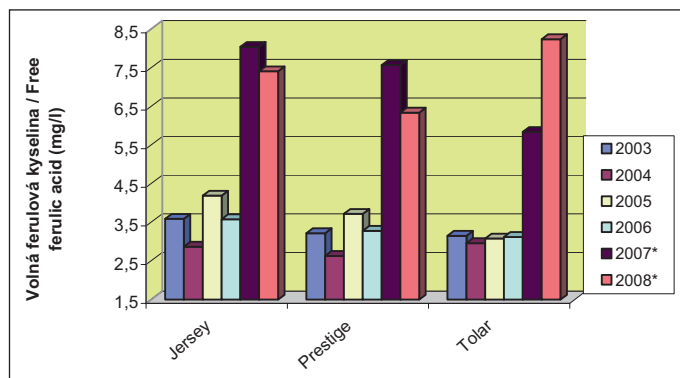


Obr. 9 Obsah volné ferulové kyseliny v ječmeni – vybrané odrůdy / Fig. 9 Ferulic acid content in barley – selected varieties (2005–2008)



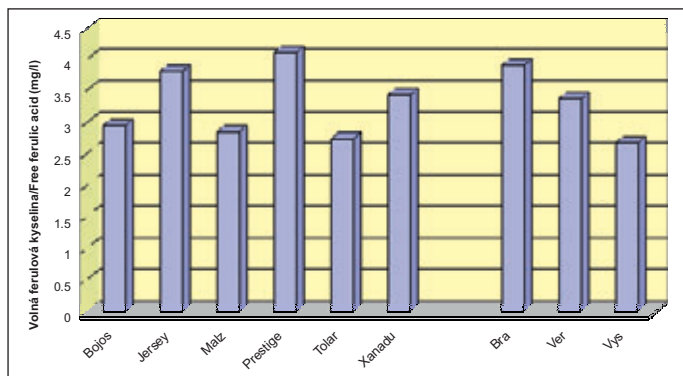
\* vylepšený analytický postup / improved analytical procedure

Obr. 10 Obsah volné ferulové kyseliny v ječmeni – vybrané odrůdy / Fig. 10 Ferulic acid content in barley – selected varieties (2003–2008)

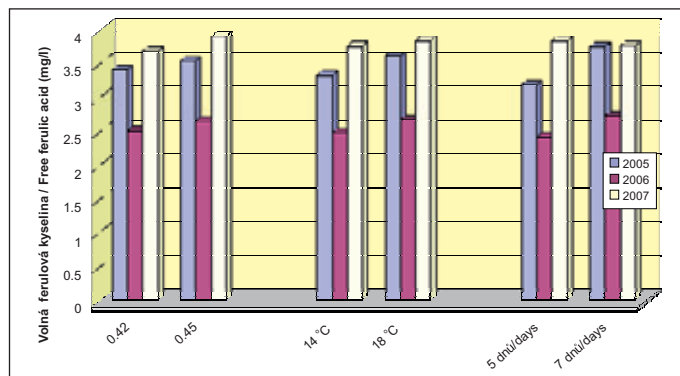


\* vylepšený analytický postup / improved analytical procedure

Obr. 11 Vliv odrůdy ječmene a pěstební lokality na obsah volné ferulové kyseliny ve sladině (sladování podle EBC) / Fig. 11 An influence of barley variety and growing locality on free ferulic acid content in wort (malting according EBC)



Obr. 12 Vliv technologie sladování na obsah volné ferulové kyseliny ve sladině / Fig. 12 The influence of malting technology on free ferulic acid content in wort



Tab. 3 Korelace obsahu ferulové kyseliny ve sladině s parametry sladu / Correlation between ferulic acid content in wort and malt parameters

Rozdíl extraktu v jemném a hrubém mletí / Extract difference in DLFU	-0.56
Relativní extrakt / Relative extract 45 °C	0.62
Rozpuštěný dusík / Soluble nitrogen	0.69
Kolbachovo číslo / Kolbach index	0.66
Friabilita / Friability	0.54
Viskozita / Viscosity	-0.64
β-glukany / β-glucans	-0.65
Arabinoxylany / Arabinoxylans	-0.08

vaně testované odrůdy (Jersey, Tolar, Prestige), nikoli pro vztah ferulové kyseliny v ječmeni a sladině obecně.

Další možný vliv odrůdových vlastností na uvolnění ferulové kyseliny ukázal pokus se slady českých a zahraničních odrůd ze tří různých lokalit. Při sladování intenzivním postupem s vysokým rozluštěním byl u českých odrůd nalezen nižší obsah ferulové kyseliny ve sladině v porovnání se zahraničními odrůdami (obr. 11). Patrný byl i vliv pěstební lokality na obsah volné ferulové kyseliny ve sladině.

### 3.3 Vliv technologie sladování na obsah ferulové kyseliny ve sladině

V tříletých laboratorních pokusech byl zkoumán vliv technologie sladování (dvě úrovně stupně domočení, teploty klíčení, doby klíčení) na obsah ferulové kyseliny v laboratorní sladině. Potvrdilo se, že obsah ferulové kyseliny ve sladině závisí na technologii sladování. Technologie sladování podporující intenzivnější rozluštění, tj. degradaci β-glukanů a proteinů (vyšší stupeň domočení, vyšší teplota a delší doba sladování), má za následek vyšší míru uvolnění ferulové kyseliny do roztoku (obr. 12). Obsah ferulové kyseliny v sladině koreloval s analytickými parametry popisujícími cytolytické a proteolytické rozluštění sladu (tab. 3). Zkrácení doby klíčení snížilo obsah volné ferulové kyseliny v provozně vyrobených sladech o 17–25 %, výrazně se ovšem snížil extrakt sladu a vzrostl obsah β-glukanů a viskozita sladiny (tab. 4). Tak je řízením procesu sladování možno ovlivnit obsah volné ferulové kyseliny ve sladině jen relativně malou měrou.

McMurrough et al. [9] zjistili pro obsah ferulové kyseliny ve sladině nad 6 mg/l množství 4-vinylguajakolu v pivu, vzniklého termickou dekarboxylací během chmelovaru na hranici senzoričského vjemu (0,3 mg/l). Obsah ferulové kyseliny v laboratorní sladině některých sladů v diskutovaných pokusech byl 5–6 mg/l. Ani u jednoho z 12% piv připravených dvourmutovým dekokčním postupem výroby sladiny s vystříkací teplotou 37 °C, varem rmutů 15 minut a 90minutovým chmelovarem nebyla skupinou školených hodnotitelů zjištěna fenolová cizí vůně či chuť.

V tříletých pokusech byla zjištěna jen slabá, nepřímo úměrná korelace mezi obsahem volné ferulové kyseliny ve sladině a zákalem laboratorní sladiny. Vztah k zákalu dekokční sladiny a filtrovatelnosti piva nebyl zjištěn. Stanovení ferulové kyseliny ve sladu se proto nejeví jako analytický parametr vhodný pro predikci filtrovatelnosti sladiny a piva.

## 4 ZÁVĚR

V provedených víceletých rozsáhlých pokusech se prokázala zá-

the use of decoction mashing procedure in domestic brewing plants relative well.

Results of free ferulic acid content assessment in wort are summarized in Tab. 2. As it is evident from varieties select from year crops 2003–2005 (Fig. 8) and varieties select from year crops 2005–2008 (Fig. 9), differences were often distinctive and statistically evidential among varieties. Year crop showed significant impact. Results of three varieties tested for 6 years (Jersey, Prestige, Tolar) are shown at Fig. 10. A ratio of total ferulic acid content in barley and free ferulic acid content in wort, i.e. ratio of its releasing during malting and mashing, depends on barley variety. There were found our good correlations for repeatedly tested varieties (Jersey, Tolar, Prestige). In general, no dependence was found out for ferulic acid content in barley and wort.

The trial with malts from Czech and foreign barley varieties from three different localities showed another possible influence of varietal behavior on ferulic acid releasing. By the use of intensive malting procedure and high malt modification there was found out lower free ferulic acid content in wort for Czech barley varieties compared with foreign varieties (Fig. 11). Also an influence of growing locality on free ferulic acid content in wort was apparent.

### 3.3 An influence of malting technology on ferulic acid content in wort

An influence of malting technology (two levels of steeping degree, temperature of germination and germination time) on ferulic acid content in laboratory wort was investigated in triennial laboratory trials. It was confirmed the ferulic acid content in wort depends on malting technology. This one supporting intensively modification, i. e. β-glucans and proteins degradation (higher steeping degree, higher temperature and longer time of germination) results in higher rate of ferulic acid release to solution (Fig. 12). Ferulic acid content in wort correlated with analytical parameters describing cytolytic and proteolytic modification of malt (Tab. 3).

Germinating time abbreviation decreased free ferulic acid content in plant scale produced malts in 17–25 % of course malt extract decreased markedly and β-glucans content in wort as well as viscosity increased (Table IV). Thus the content of free ferulic acid in wort is possible to influence only in relative small size by means of malting process controlling.

McMurrough et al. [9] found out in beer wort boiling produced 4-vinyl guaiacol by thermal decarboxylation, in amounts close to its taste threshold (0.3 mg/L), from worts that contained amounts of free ferulic acid higher 6 mg/L. Ferulic acid content in laboratory worts of some malts prepared in trials discussed was 5–6 mg/L. There were fenolic off flavor by the panel of trained tasters in none of beers prepared by two mash decoction mashing procedure with mashing in temperature 37 °C, 15 min. mash boiling and 90 min. wort boiling not found out.

There was determined only weak negative correlation between free ferulic acid content in wort and laboratory wort haze value in triennial laboratory trials. Relation to decoction wort and beer filterability was not found out. Therefore ferulic acid content determination in malt appears to be not a suitable analytical parameter for wort and beer filterability prediction.

## 4 CONCLUSION

Dependence of ferulic acid content in barley on barley variety, growing locality and year crop was evidenced in large multiannual trials.

Tab. 4 Vliv doby klíčení na obsah volné ferulové kyseliny ve sladině / An influence of germination period on free ferulic acid content in wort

Odrůda / Variety Doba sladování dny / Malting time days		Jersey		Malz		Prestige		Tolar		Sebastian	
		6	4	6	4	6	4	6	4	6	4
Extrakt / Extract	%	81.8	81.3	83.0	82.8	82.8	81.7	81.7	80.7	83.5	82.1
Rozdíl extraktu v jemném a hrubém mletí / Extract difference in DLFU	%	1.0	1.6	1.3	1.8	0.8	1.9	1.1	2.5	1.0	2.0
Viskozita / Viscosity	mPa.s	1.47	1.53	1.51	1.58	1.49	1.71	1.50	1.60	1.48	1.58
Kolbachovo číslo / Kolbach index	%	43	42	38	37	39	34	37	38	41	38
Friabilita / Friability	%	93	77	87	75	91	69	91	73	86	70
β-glukany / β-glucans	mg/l	99	359	200	433	160	838	146	608	151	507
Arabinoxylany / Arabinoxylans	mg/l	781	870	808	936	598	536	743	723	626	542
Ferulová kyselina / Ferulic acid	mg/l	3.41	2.65	3.66	3.02	2.75	2.26	3.04	2.27	5.98	4.83



vislost obsahu ferulové kyseliny v ječmeni na odrůdě ječmene, pěstební lokalitě a ročníku sklizně. Rovněž sledování volné ferulové kyseliny v laboratorní sladině prokázalo závislost jejího obsahu na odrůdě ječmene, ročníku sklizně i pěstební lokalitě. Žádný z těchto faktorů nebyl dominantní. Bylo zjištěno, že podíl volné ferulové kyseliny ve sladu a ferulové kyseliny uvolněné při rmutování byl závislý na odrůdě ječmene. Odrůdově specifický byl i poměr celkového obsahu ferulové kyseliny v ječmeni a volné ferulové kyseliny ve sladině.

V tříletých laboratorních pokusech byl zkoumán vliv technologie sladování (dvě úrovně stupně domočení, teploty klíčení, doby klíčení) na obsah ferulové kyseliny. Zjistilo se, že technologie sladování podporující degradaci  $\beta$ -glukanů (vyšší domočení, vyšší teplota a delší doba sladování) a rovněž tak rozštěpení proteinů má za následek vyšší míru uvolnění ferulové kyseliny do roztoku. Technologií sladování je možno snížit obsah volné ferulové kyseliny asi o 20 %, ovšem za cenu snížení extraktu sladu a zvýšení rizika zhoršené filtrovatelnosti. U 12% ležáckých piv připravených dvourmutovým dekokčním postupem ze sladu s obsahem volné ferulové kyseliny nad kritickou hranicí 6 mg/l nebyla zjištěna fenolová cizí vůně či chuť.

#### Poděkování

Tato práce byla podpořena projektem 1M0570 „Výzkumné centrum pro studium obsahových látek ječmene a chmele“ Ministerstva školství, mládeže a tělovýchovy České republiky.

Likewise investigation of free ferulic content in laboratory wort evidenced dependence of its content on barley variety, growing locality and year crop. None of these factors was dominant. There was determined that a ratio of free ferulic acid in malt and ferulic acid released during mashing depends on barley variety. Also ratio of total ferulic acid content in barley and free ferulic acid content in wort is varietal specific.

An influence of malting technology (two levels of steeping degree, temperature of germination and germination time) on ferulic acid content in laboratory wort was investigated in triennial laboratory trials. It was found out malting technologies supporting  $\beta$ -glucans and proteins degradation (higher steeping degree, higher temperature and longer time of germination) results in higher rate of ferulic acid release to solution. It is possible to reduce free ferulic content by malting technology, but at the price of malt extract decrease and the risk of aggravated filterability increase. There were not found out fenolic off flavor in beers prepared by two mash decoction mashing procedure from malts with free ferulic content above critical limit 6 mg/L.

#### Acknowledgements

This work was supported by grant MSM 1M0570 “Research Centre of Extract Compounds of Barley and Hops” of Ministry of Education, Youth and Sports of Czech Republic.

#### LITERATURA / REFERENCES

1. Bamforth, C. W., Kanauchi, M.: A Simple Model for the Cell Wall of the Starch Endosperm in Barley. *J. Inst. Brew.* **107**, 2001, 235–240.
2. Pejin, J., Grujić, O., Čanadanović-Brunet, J., Vujić, D., Tumbas, V.: Investigation of Phenolic Acids Content and Antioxidant Activity in: Malt Production. *J. Am. Soc. Brew. Chem.* **67**, 2009, 81–88.
3. Kanauchi, M., Bamforth, C.W.: Enzymic digestion of walls purified from the starch endosperm of barley. *J. Inst. Brew.* **108**, 2002, 73–77.
4. Sarx, G. H.: Influence of malt quality on the lauter process. VLB-Meeting, Berlin, October 2002.
5. Sancho, A. J., Faulds, C. B., Bartolomé, B., Williamson, G.: Characterisation of Feruloyl Esterase Activity in Barley. *J. Sci. Food Agric.* **79**, 1999, 447–449.
6. Humberstone, F. J., Briggs, D. E.: Partial Purification of Ferulic Acid Esterase from Malted Barley. *J. Inst. Brew.* **108**, 2002, 439–443.
7. Sun, A., Faulds, C. B., Bamforth, C. W.: Barley Contains Two Cationic Acetylxylen Esterases and One Anionic Feruloyl Esterase. *Cereal Chem.* **82**, 2005, 621–625.
8. Humberstone, F. J., Briggs, D. E.: Extraction and Assay of Ferulic Acid Esterase from Malted Barley. *J. Inst. Brew.* **106**, 2000, 21–29.
9. McMurrough, I., Madigan, D., Donnelly D., Hurley, J., Doyle, A. M., Hennigan, G., McNulty, N., Smith, N. R.: Control of Ferulic Acid and 4-vinyl guajacol in Brewing. *J. Inst. Brew.* **102**, 1996, 327–332.
10. Vanbeneden, N., Delvaux, F. and Delvaux, F. R.: Determination of Hydroxycinnamic Acids and Volatile Phenols in Wort and Beer by Isocratic High-performance Liquid Chromatography Using Electrochemical Detection. *J. Chromatography A*. **1136** (2), 2006, 237–242.
11. Vanbeneden, N., Gils, F., Delvaux, F. and Delvaux, F. R.: Formation of 4-vinyl and 4-ethyl Derivatives from Hydroxycinnamic Acids: Occurrence of Volatile Phenolic Flavour Compounds in Beer and Distribution of Pad-activity Among Brewing Yeasts. *Food Chemistry* **107**, 2008, 221–230.
12. Walters, M. T., Heasman, A. P., Hughes, P. S.: Comparison of (+)-catechin and ferulic acid as natural antioxidants and their impact on beer flavor stability. Part 1: Forced-aging. *J. Am. Soc. Brew. Chem.* **55**, 1997, 83–89.
13. Walters, M. T., Heasman, A. P., Hughes, P. S.: Comparison of (+)-catechin and ferulic acid as natural antioxidants and their impact on beer flavor stability. Part 2: Extended storage trials. *J. Am. Soc. Brew. Chem.* **55**, 1997, 91–98.
14. Meilgaard, M. C.: Flavor Chemistry of Beer Part 11: Flavor and Threshold of 239 Aroma Volatiles. *MBAA Technical Quarterly* **12**, 1975, 151–168.
15. Iyuke, S. E., Madigoe, E. M., Maponya, R.: The Effect of Hydroxycinnamic Acids and Volatile Phenols on Beer Quality. *J. Inst. Brew.* **114**, 2008, 300–305.
16. Clausen, M., Lamb, C. L., Megnet, R. and Doemer, P. W.: PAD 1 Encodes Phenylacrylic Acid Decarboxylase which Confers Resistance to Cinnamic Acid in *Saccharomyces cerevisiae*. *Gene* **142**, 1994, 107–112.
17. Van Beek, S., Priest, F. G.: Decarboxylation of Substituted Cinnamic Acids by Lactic Acid Bacteria Isolated during Malt Whisky Fermentation. *Applied and Environmental Microbiology* **66**, 2000, 5322–5328.
18. Moore, J., Liu, I.-G., Zhou, K., Yu, L.: Effects of Genotype and Environment on the Antioxidant Properties of Hard Winter Wheat Bran. *J. Agric. Food Chem.* **54**, 2006, 5313–5322.
19. Zupfer, I. M., Churchill, K. E., Rasmussen, D. C., Fulcher, R. G.: Variation in Ferulic Acid Concentration among Diverse Barley Cultivars Measured by HPLC and Microspectrophotometry. *J. Agric. Food Chem.* **46**, 1998, 1350–1354.
20. Psota, V., Horáková, V., Kopřiva, R., Malting Barley Varieties Registered in the Czech Republic in 2008. *Kvasny Prum.* **54**, 2008, 186–192.
21. Prýma, J., Havlová, P., Gadas, G.: Stanovení kyseliny ferulové v pivovarských surovinách, X. konference Súčasný stav a perspektívy analytickej chémie v praxi. Zborník vedeckých prác. Bratislava, Katedra analytickej chémie STU v Bratislave 2005. 28–30.
22. Běláková, S., Mikulíková, R., Svoboda, Z., Macuchová, S.: Monitoring of ferulic acid content during the malt production, *Chem. Listy* **102**, 2008 (spec.iss.15), 595–596.
23. Analytica EBC, 5<sup>th</sup> edition, European Brewery Convention, Nürnberg: Fachverlag Hans Carl, 1998.
24. Basařová G.: Pivovarsko-sladařská analytika, Praha: Merkanta, 1994.
25. Mikýška, A., Prokeš, J., Hašková, D., Havlová, P., Poledníková, M.: Einfluss von Sorte und Anbauggebiet auf den Gehalt an Pentosanen und  $\beta$ -Glucanen in Gerste, Malz und Würze. *Monatsschr. Brauwiss.* **55**, 2002, 88–95.

Recenzovaný článek / Reviewed paper

Do redakce došlo / Manuscript received: 10. 12. 2009

Přijato k publikování / Accepted for publication: 7. 1. 2010